

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**22 septembre 2005 (22.09.2005)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 2005/087362 A1**

---

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : B01J 13/12, 13/04**

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
PCT/FR2005/000511

**(22) Date de dépôt international :** 3 mars 2005 (03.03.2005)

**(25) Langue de dépôt :** français

**(26) Langue de publication :** français

**(30) Données relatives à la priorité :**  
0402204 3 mars 2004 (03.03.2004) FR

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :**  
ETHYPHARM [FR/FR]; 21, rue Saint Mathieu, F-78550 HOUDAN (FR).

**(72) Inventeurs; et**

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** ROYERE, Audrey [FR/FR]; 24, rue Robert Le Fort, F-49100 ANGERS (FR). BAZILE, Didier [FR/FR]; 14, rue des Prévoyants de l'Avenir, F-49100 ANGERS (FR). BI-BETTE, Jérôme [FR/FR]; 4, rue Malebranche, F-75005 PARIS (FR).

**(74) Mandataires :** COLOMBET, Alain etc.; Cabinet Lavoix, 2, Place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS CEDEX 09 (FR).

**(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

— *avec rapport de recherche internationale*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

---

**(54) Title: METHOD FOR PREPARING CALIBRATED BIODEGRADABLE MICROSPHERES**

**(54) Titre : PROCEDE DE PREPARATION DE MICROSPHERES BIODEGRADABLES CALIBREES**

**(57) Abstract:** The invention relates to a method for preparing monodispersed biodegradable microspheres consisting in a) preparing an emulsion containing at least one polymeric phase and at least one aqueous phase at a viscosity ratio between the dispersed polymeric phase and the aqueous phase ranging from 0.12 to 10, b) exposing the thus obtained emulsion to a controlled laminar shear strength, c) removing a solvent from the polymeric phase and in d) isolating the thus obtained microspheres. The use of the prepared microspheres is also disclosed.

**(57) Abrégé :** L'invention concerne un procédé de préparation de microsphères biodégradables monodispersées comprenant les étapes de : a) préparation d'une émulsion comportant au moins une phase polymérique et au moins une phase aqueuse, le rapport des viscosités entre la phase polymérique dispersée et la phase aqueuse continue étant comprise entre 0,1 et 10 ; b) soumission de l'émulsion obtenue à un cisaillement laminaire contrôlé ; c) élimination du solvant de la phase polymérique ; et d) isolement des microsphères ainsi obtenues. Elle concerne aussi les utilisations des microsphères ainsi préparées.

**WO 2005/087362 A1**

## Procédé de préparation de microsphères biodégradables calibrées.

L'invention concerne l'industrie pharmaceutique. Plus précisément, elle concerne la préparation de microsphères biodégradables monodisperses, notamment pour l'administration de principes actifs pharmaceutiques.

5 Il est connu d'encapsuler des principes actifs pharmaceutiques dans des microsphères pour faciliter leur administration ou éviter leur dégradation *in vivo*.

La microencapsulation consiste à enrober des substances solides ou liquides de manière à en faire des particules, dont la taille varie de 0,1 à 1000  $\mu\text{m}$ .

10 Dans ce cadre, on a notamment envisagé l'utilisation de microsphères biodégradables, lesquelles délivrent le principe actif sur une période prolongée.

On connaît différentes techniques de préparation de microsphères biodégradables.

Ainsi, on connaît du brevet US 5,643,607 des microcapsules pour 15 l'administration prolongée de principes actifs hydrophiles, en particulier de peptides. Les microcapsules sont préparées par microencapsulation d'une émulsion dont la phase aqueuse dispersée contient le principe actif et la phase continue contient un polymère.

Cependant, on constate que la cinétique de libération de l'actif contenu 20 dans ces microsphères est inhomogène. Cet effet est dû au fait que les microsphères présentent une distribution granulométrique large. Or la libération du principe actif à partir des microsphères repose sur des effets de diffusion et est donc généralement ralentie pour des microsphères de taille croissante, se prolongeant sur de plus longues périodes.

25 Un procédé de préparation de microsphères monodisperses consiste à passer une solution de polymère à travers une buse soumise à une vibration, chacune des vibrations entraînant la rupture du flux sortant de la buse pour former une gouttelette (Berkland *et al.* *J. Controlled Release* 73 (2001), 59-74). Ce procédé est complexe et long et présente un faible rendement. En outre, il 30 paraît difficile à transposer à l'échelle industrielle. Par ailleurs, il ne permet pas toujours d'assurer une répartition homogène du principe actif au sein des

microcapsules, dans la mesure où il repose sur un phénomène de précipitation instantanée.

Aussi, la présente invention a pour but de proposer un procédé de 5 préparation de microcapsules biodégradables monodisperses et de taille contrôlée, notamment destinées au transport de principes actifs aussi bien hydrosolubles que liposolubles.

On connaît du brevet FR 2 747 321 une méthode de préparation d'émulsions monodisperses par cisaillement laminaire contrôlé dans un 10 dispositif de type Couette. Toutefois, ce procédé ne vise que des émulsions de lipides et non pas des systèmes complexes dans lesquels la phase organique comprend un polymère et un solvant organique.

L'invention repose principalement sur la constatation que l'obtention 15 d'une émulsion contenant au moins une phase organique polymérique est possible lorsque le rapport des viscosités entre la phase dispersée et la phase continue ( $\eta_{\text{org}}/\eta_{\text{aq}}$  dans le cas d'une émulsion directe ou  $\eta_{\text{aq}}/\eta_{\text{org}}$  dans le cas d'une émulsion inverse) est compris entre 0,1 et 10.

Ainsi, l'invention vise plus précisément un procédé de préparation de microsphères biodégradables monodisperses comprenant les étapes de :

- 20 a) préparation d'une émulsion comportant au moins une phase polymérique et au moins une phase aqueuse, le rapport des viscosités entre la phase dispersée et la phase continue doit être comprise entre 0,1 et 10 ;
- b) soumission de l'émulsion obtenue à un cisaillement laminaire 25 contrôlé ;
- c) élimination du solvant de la phase polymérique ; et
- d) isolement des microsphères ainsi obtenues.

Dans la présente invention, on désigne par le terme « microsphères » 30 des unités sphériques de diamètre compris entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 1000  $\mu\text{m}$ , plus particulièrement entre 0,7  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$ .

Les microsphères selon l'invention sont constituées d'une matrice à base de polymère. Elles se prêtent ainsi particulièrement bien à l'administration de principes actifs sensibles à la chaleur, par exemple les protéines ou les polypeptides. En effet, alors que la phase lipidique est transformée en liquide 5 par le biais de chauffage, la mise en forme des microsphères polymériques repose sur la mise en solution du polymère dans un solvant organique. Après élimination du solvant, les composants polymériques des microsphères forment une matrice uniforme dans laquelle peut être encapsulé un principe actif. Les microsphères polymériques peuvent donc être fabriquées sans élévation de la 10 température.

Selon la solubilité du principe actif, celui-ci peut être encapsulé directement dans la phase polymérique, soit au sein de microgouttelettes de phase aqueuse contenues dans la matrice polymérique des microsphères. Généralement, il sera encapsulé dans la matrice polymérique lorsque le principe 15 actif est liposoluble. Au contraire, il est encapsulé en phase aqueuse interne lorsque le principe actif est hydrosoluble. Certains principes actifs présentent une faible solubilité à la fois dans l'eau et dans les solvants apolaires. Dans ce cas, on peut disperser le principe actif à l'état solide dans la solution de polymère.

20 L'administration des principes actifs ni liposolubles ni hydrosolubles est particulièrement délicate par le biais des formes galéniques connues. Les microsphères selon l'invention paraissent donc particulièrement intéressantes pour l'administration de ces principes actifs.

On entend par « biodégradable » dans la présente demande un matériau 25 qui se dégrade dans un milieu biologique et dont les produits de dégradation sont éliminés par filtration rénale ou métabolisés. Les polymères biodégradables sont définis comme des polymères synthétiques ou naturels, dégradables *in vivo* de manière enzymatique ou non enzymatique, pour produire des produits de dégradation non toxiques.

30 Cette dégradation a généralement lieu en un temps allant de quelques semaines à quelques mois (exemple : le PGA-TMC est absorbé en 7 mois alors que le L-PLA a une durée de dégradation d'environ 2 ans).

Le temps de dégradation d'un polymère dépend de son type, donc de la nature chimique des unités monomères, mais aussi de son degré de polymérisation, de sa cristallinité. Par ailleurs, outre le matériau, il dépendra notamment de la surface de matériau accessible aux enzymes ou autres 5 substances dégradantes. Ainsi, le matériau sera dégradé d'autant plus rapidement qu'il est finement divisé.

Les microsphères sont dégradées de sorte que la quantité de polymère accumulée dans l'organisme ne dépasse pas une quantité équivalente à 20 fois la dose de polymère administrée par administration. De préférence, la quantité 10 de polymère accumulée dans l'organisme ne dépasse pas une quantité équivalente à 10 fois la dose de polymère administrée par administration

L'intervalle séparant deux administrations successives de microsphères selon l'invention est généralement au moins un jour, de préférence entre 1 jour et 30 jours, et en particulier entre 5 et 14 jours.

15 Ainsi, on assure que les microsphères ne s'accumulent dans le corps.

Les microsphères selon la présente invention comprennent une matrice polymérique dans laquelle peuvent être répartis un ou plusieurs principes actifs ou des gouttelettes de solution aqueuse pouvant elles-mêmes contenir un ou plusieurs principes actifs.

20 Le ou les principes actifs peuvent être, indépendamment les uns des autres, hydrosolubles ou peu hydrosolubles, liposolubles ou peu liposolubles ou encore à la fois peu liposolubles et peu hydrosolubles.

En effet, il est possible, dans le cas de compositions dont la phase 25 dispersée comporte une phase aqueuse interne, de véhiculer par exemple, seul ou en association avec les principes actifs peu hydrosolubles, des principes actifs hydrophiles.

Le principe actif peut être notamment un principe actif pharmaceutique, vétérinaire, phytosanitaire, cosmétique ou agroalimentaire. Par ailleurs, il peut être un détergent, un nutriment, un antigène ou un vaccin. De préférence, il 30 s'agit d'un principe actif pharmaceutique.

De préférence, le principe actif pharmaceutique est choisi parmi les groupes constitués par les antibiotiques, hypolipidémiants, antihypertenseurs,

agents antiviraux, betabloqueurs, bronchodilatateurs, cytostatiques, agents psychotropes, hormones, vasodilatateurs, anti-allergiques, antalgiques, antipyrétiques, antispasmodiques, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques, antibactériens, anti-ulcéreux, antifongiques, anti-parasitaires, antidiabétiques, 5 antiépileptiques, antiparkinsoniens, antimigraineux, anti-Alzheimer, antiacnéiques, antiglaucomateux, antiasthmatiques, neuroleptiques, antidépresseurs, anxiolytiques, hypnotiques, normothymiques, sédatifs, psychostimulants, anti-ostéoporoses anti-arthritiques, anticoagulants, antipsoriasis, hyperglycémiants, orexigènes, anorexigènes, antiasthéniques, 10 anti-constipation, anti-diarrhéiques, anti-traumatiques, diurétiques, myorelaxants, médicaments de l'enurésie, médicaments des troubles de l'érection, vitamines, peptides, protéines, anticancéreux, acides nucléiques, ARN, oligonucléotides, ribozymes et l'ADN.

Par ailleurs, il peut se révéler avantageux d'associer le ou les principes 15 actifs à un agent modulant l'absorption par voie orale ou à un inhibiteur enzymatique, par exemple un inhibiteur de la P-glycoprotéine ou un inhibiteur de protéase.

On entend par le terme « monodisperse » désigner une population de 20 microsphères dont le diamètre de chaque microsphère est très proche du diamètre moyen de la population. Une population est dite « monodisperse » lorsque la polydispersité est inférieure ou égale à 40%, et de préférence de l'ordre de 5 à 30%, par exemple entre 15 et 25%. La polydispersité est alors définie comme étant le rapport de l'écart-type à la médiane de la distribution du diamètre des gouttelettes ou globules représenté en volume.

25 Les microsphères monodisperses selon la présente invention sont obtenues en soumettant une émulsion comprenant à titre de phase dispersée des gouttelettes de phase polymère (contenant ou non des gouttelettes d'eau interne) comprenant un ou plusieurs principes actifs à un cisaillement contrôlé. En outre, un cisaillement paramétrable et contrôlable permet de contrôler la 30 taille des microsphères et par ce biais la libération du principe actif et son élimination de l'organisme.

De préférence, on met en œuvre cette étape dans un appareil de type Couette. On obtient ainsi des microsphères dont la distribution de taille est resserrée et homogène.

Le procédé de préparation des microsphères conforme à l'invention 5 présente l'avantage d'être un procédé simple et de n'utiliser qu'une quantité faible de solvant. Il peut être transposé aisément à une échelle industrielle.

De plus, ce procédé présente un fort rendement d'encapsulation de principe actif dans les microsphères. On entend par rendement d'encapsulation le rapport entre le principe actif encapsulé et le principe actif mis en œuvre. 10 Celui-ci peut être optimisé dans le procédé par un coefficient de partage entre la phase aqueuse et la phase organique favorable à la solubilisation du principe actif dans la phase organique et une concentration élevée de l'émulsion en phase organique. Plus précisément, le procédé consiste à préparer, dans une première étape, une émulsion comportant au moins une phase organique et au 15 moins une phase aqueuse.

Dans le cas où il y a une phase organique et une phase aqueuse, on prépare une émulsion simple directe.

On entend par le terme « émulsion directe » une émulsion dans laquelle une phase organique est dispersée dans une phase aqueuse. En opposition, 20 dans une émulsion « inverse », une phase aqueuse est dispersée dans une phase organique.

L'émulsion directe est notamment utile pour encapsuler un principe actif liposoluble (solubilisé dans la phase organique).

La réalisation de microsphères à partir d'émulsions doubles est toutefois 25 également possible. Ces émulsions comportent deux phase aqueuses : une phase aqueuse dite « interne », laquelle est dispersée dans la phase organique, elle-même dispersée dans la phase aqueuse dite « externe ». La phase aqueuse interne permet alors la dissolution de principes actifs hydrophiles et en particulier de principes actifs fragiles tels que des protéines ou des polypeptides 30 par exemple.

Ainsi, suivant que l'on veut encapsuler des principes actifs lipophiles ou hydrophiles, on utilisera soit une émulsion simple directe, soit une émulsion

double E/Org/E. L'émulsion double est également un moyen d'obtenir des microsphères encapsulant plusieurs principes actifs, par exemple une combinaison d'un principe actif hydrophile (solubilisé dans la phase aqueuse interne) avec un principe actif hydrophobe (solubilisé dans la solution organique 5 contenant le polymère).

La phase organique de l'émulsion contient au moins un polymère biodégradable dissout dans un solvant organique.

La phase organique des émulsions contient avantageusement entre 5 et 10 30 % d'au moins un polymère biodégradable et préférentiellement entre 10 et 20 % en masse de la masse totale de phase organique.

Le polymère est choisi parmi les polymères biodégradables non toxiques pour l'homme ou l'animal. Il sera en outre avantageusement inerte par rapport au principe actif et insoluble dans l'eau.

Le ou les polymères biodégradables utilisés sont préférentiellement des 15 polymères approuvés pour un usage dans la voie d'administration considérée (par exemple parentérale). D'une manière préférée, on utilisera comme polymères biodégradables des polymères dont les produits de dégradation peuvent être éliminés facilement par l'organisme.

Parmi ces polymères, on peut citer notamment ceux dérivés de l'acide 20 lactique, et en particulier de la famille des  $\alpha$ -hydroxy acides tels que le PLGA (acide poly-lactique et glycolique). Ces polymères sont approuvés pour un usage parentéral chez l'homme. Ils présentent par ailleurs une cinétique de dégradation dans l'organisme adaptée en terme de libération du principe actif. Le degré de cristallinité du polymère va directement influencer son caractère 25 hydrophile ainsi que la rapidité de sa dégradation *in vivo*.

Ces polymères sont dégradés dans l'organisme par un mécanisme chimique d'hydrolyse non spécifique ou par une dégradation enzymatique. Les monomères qui en résultent sont métabolisés et conduisent à des produits de dégradation éliminés majoritairement par voie respiratoire sous forme de 30 dioxyde de carbone et d'eau.

Ainsi, on pourra utiliser pour la réalisation de la présente invention des polymères choisis parmi les poly( $\alpha$ -hydroxy-acides), les polyesters aliphatiques

des poly( $\alpha$ -hydroxy-acides), des poly( $\epsilon$ -caprolactones)-PCL, des polydioxanones – PDO, les polyorthoesters, les polyanhydrides, les polycyanoacrylates, les polyuréthannes, les polypeptides ou poly(amino-acides), les polysaccharides modifiés, la cellulose, les polycarbonates, les 5 polydiméthylsiloxanes et les poly(vinyl-acétates) ainsi que leurs dérivés et copolymères.

Les polymères de la classe des poly( $\alpha$ -hydroxy-acides) sont des polyesters dont les unités de répétition dérivent des  $\alpha$ -hydroxy-acides, tels que les poly(glycolide) (PGA), les poly(lactide) (PLA), les poly(lactide-co-glycolide) 10 (PLAGA ou PLGA), les copolymères glycolide-co-triméthylène carbonate ou polyglyconates (PGA-TMC). Ils sont disponibles dans le commerce (par exemple sous les dénominations Resomer®, Medisorb®).

D'autres polymères peuvent être envisagés tels que les terpolymères issus de la polymérisation du glycolide avec du triméthylène carbonate et de la 15 p-dioxanone, ou les copolymères blocs tels que les polyéthylène glycol – poly( $\alpha$ -hydroxy-acides) (PLA-PEG, PLGA-PEG) ou les méthoxy-polyéthylène glycol – poly( $\alpha$ -hydroxy-acides).

De même que pour les  $\alpha$ -hydroxy acides, le degré de cristallinité du polymère va directement influencer son caractère hydrophile ainsi que la 20 rapidité de sa dégradation *in vivo*.

La  $\epsilon$  -caprolactone est un ester de l'acide hydroxy-6-caproïque. La poly( $\epsilon$  -caprolactone) et ses copolymères obtenus avec l'acide lactique sont des polymères semi-cristallins utilisés dans la composition de formes médicamenteuses à libération contrôlée. Ces polymères sont dégradés dans 25 l'organisme de manière similaire à celle des PLA et PLGA (dégradation non enzymatique). Un tel polymère est commercialisé sous le nom de Lactel®

Les polydioxanones – PDO sont des polyether-esters obtenus par ouverture du cycle de la p-dioxanone.

Certains principes actifs sont instables, notamment ceux qui sont sujets à 30 une hydrolyse rapide. Il sera donc contre-indiqué d'utiliser des polymères qui retiennent l'eau. Dans ce cas, des polymères plus hydrophobes et qui se

dégradent par érosion de surface sont à privilégier, tels que les polyorthoesters et les polyanhydrides.

5 Les polyorthoesters sont des composés issus de la condensation de 2,2-diéthoxytétrahydrofurane avec un diol. Ces polymères ont pour produits de dégradation des composés acides qui catalysent le processus de dégradation. La dégradation s'accélère donc au cours du temps. Ils sont commercialisés sous le nom de Chronomer® et Alzamer®, par exemple.

10 Les polyanhydrides sont des composés dérivés de l'acide sébacique p(SA) et du bis p(carboxyphénoxy)propane p(CPP). L'acide sébacique peut aussi être associé à un dimère d'acide gras (acide oléique : p(FAD-SA). Leur temps de dégradation peut varier de quelques jours à quelques années selon le degré d'hydrophobicité du monomère utilisé. Ils sont dégradés grâce à une érosion de surface et possèdent une excellente biocompatibilité.

15 Parmi les polycyanoacrylates sont préférés les polycyanoacrylates à longue chaîne alkyle, lesquels se dégradent lentement et engendrent peu de réaction inflammatoire des tissus. De tels polymères sont disponibles sous le nom de Desmolac® (BAYER).

20 Les polypeptides ou poly(amino acids) sont des polyamides résultant de la condensation de molécules présentes naturellement dans l'organisme. Afin d'obtenir un matériau qui s'hydrolyse graduellement au cours du temps, les polymères issus d'acides aminés simples (hydrophiles) et de dérivés hydrophobes d'acides aminés, tels que les esters méthylique ou benzylique de l'acide aspartique sont préférés.

25 Le mécanisme supposé de dégradation est tout d'abord une hydrolyse des fonctions esters (ponts di-sulfures) donnant des macromolécules hydrosolubles, puis un processus de diffusion vers le foie et les reins dans lesquels les liaisons peptidiques sont rompues par attaque enzymatique. A titre d'exemple de cette classe de polymère, on peut citer l'Ultramid A4 Naturel (BASF).

30 Parmi les dérivés de cellulose, on peut mentionner plus particulièrement la méthylcellulose et l'éthylcellulose, commercialisées par exemple sous le nom

de Blanose®, Ethocel® (Dow Cemica), Pharmacoat®603 ou 606 (ShinEtsu Chemical), Aqualon EC® (Aqualon company).

A titre de polycarbonate, on peut citer le poly(triméthylène carbonate) (Poly(TMC)) et le poly(propylène carbonate), disponible sous le nom 5 d'Araconate 5 000.

Parmi les poly(vinylacétates), on préfère particulièrement le copolymère d'éthylène et d'acétate de vinyle (EVA), disponible par exemple sous le nom de Coathylene® (plast-Labor SA).

De préférence, les polymères présents dans la phase organique 10 présentent une masse moléculaire moyenne comprise entre 50 et 500 kDaltons, et en particulier entre 100 et 200 kDaltons.

De manière tout à fait préférée, les microsphères sont préparées à partir de la famille des PLGA. Dans la famille de ces polymères se sont révélés particulièrement convenables le PLGA 75/25 (lactique/glycolique) ou 85/15 15 vendus sous la dénomination "High IV", ayant un poids moléculaire compris entre 110 et 160 kDaltons.

Ces polymères présentent des propriétés d'hydrophobicité différentes, en fonction de la proportion d'unités d'acides lactiques. Ainsi, plus la concentration en acide lactique augmente, plus le PLGA sera hydrophobe.

20 D'autre part, la cinétique de dégradation du polymère est d'autant plus longue que la proportion d'acide lactique est élevée. Cette caractéristique du polymère influera sur la cinétique de libération du principe actif encapsulé. Ces caractéristiques différentes d'un PLGA à l'autre permettent donc d'envisager l'utilisation de l'un ou l'autre, voire d'un mélange de ces copolymères, en 25 fonction des caractéristiques de libération souhaitées.

Par ailleurs, les copolymères PLGA sont solubles dans plusieurs solvants organiques comme le chloroforme, le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle alors qu'ils sont pratiquement insolubles dans l'eau.

Enfin, ce type de polymère est dégradé par hydrolyse et les produits de la 30 réaction sont métabolisés en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O, éliminés lors de la respiration.

Le solvant organique utilisé pour la préparation des microsphères est de préférence approuvé pour un usage parentéral chez l'homme. Il est par ailleurs

choisi pour permettre une bonne dissolution de ces polymères, de préférence à température ambiante.

Le solvant organique présente, par ailleurs, de préférence une certaine solubilité dans l'eau. En effet, un des modes de réalisation de l'élimination du solvant ultérieure consiste à extraire le solvant par diffusion dans un grand volume d'eau. Il est également possible d'éliminer le solvant par évaporation. De tels solvants incluent par exemple l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane.

L'acétate d'éthyle est un solvant incolore et volatil modérément soluble dans l'eau (8,7g/100g d'eau à 20°C) dont la solubilité dans l'eau diminue lorsque la température augmente. Il est par ailleurs bien toléré par l'organisme et ne pose pas de problème particulier en terme d'environnement.

Avantageusement, la phase organique de l'émulsion est saturée en eau et inversement la (ou les) phase(s) aqueuse(s) est (sont) saturée(s) en solvant organique, afin de limiter les fuites d'eau de la phase aqueuse vers la phase organique et inversement.

La phase organique peut en outre avantageusement contenir un principe actif lipophile ou peu liposoluble et peu hydrosoluble.

La phase aqueuse de l'émulsion directe ainsi que la phase aqueuse dite « externe » de l'émulsion double contient outre de l'eau de préférence d'autres agents. De préférence, ces agents sont approuvés pour usage parentéral. Ainsi, on ajoute de préférence des agent stabilisants, généralement des agents tensioactifs afin d'augmenter la stabilité de l'émulsion.

On pourra avantageusement utiliser des tensioactifs non ioniques comme le PVA (alcool polyvinyle) ou des tensioactifs non ioniques comme le polysorbate monooléate (tween 80 ou Montanox 80). De préférence, le PVA mis en œuvre a un poids moléculaire compris entre 30 et 200 kDaltons.

Ce tensioactif non ionique est par exemple hydrolysé à 88 %. Il est par ailleurs particulièrement avantageux dans la mesure où il augmente la viscosité de la phase aqueuse dite « externe ».

Dans le cas d'une émulsion double, la phase aqueuse externe comporte avantageusement également au moins un agent d'osmolarité afin d'équilibrer la

pression osmotique avec la phase aqueuse interne. On évite ainsi les fuites du principe actif vers le milieu extérieur.

Un agent d'osmolarité habituellement utilisé est le glucose ou tout autre sucre comme le mannitol, le tréhalose, mais des sels comme le chlorure de sodium par exemple peuvent également convenir.

L'agent d'osmolarité est présent dans la phase aqueuse externe en principe en quantité suffisante pour atteindre la concentration ionique présente dans la phase aqueuse interne. Généralement, la concentration en agent d'osmolarité est alors de 0,1 à 20 % en poids par rapport au poids de la phase aqueuse. Préférentiellement, on utilisera ce sel dans la phase aqueuse interne à une concentration de 0,6% (m/m) qui est la concentration la plus adaptée aux préparations injectables. Préférentiellement, on utilisera du glucose dans la phase aqueuse externe à une concentration de 11,5% (m/m) qui est la quantité nécessaire pour égaler la concentration ionique présente dans la phase aqueuse interne.

Enfin, la phase aqueuse de l'émulsion contient avantageusement au moins un agent de viscosité permettant d'ajuster la viscosité de la phase afin qu'elle soit acceptable pour la mise en œuvre de la seconde étape décrite ci-dessous. Ces agents contribuent également à stabiliser les émulsions doubles en limitant la coalescence des gouttes en suspension.

Elle contient généralement 10 à 80 %, de préférence 30 à 70%, préférentiellement entre 40 et 60 % en poids d'agents de viscosité par rapport au poids total de l'émulsion.

De manière générale, on pourra choisir l'agent de viscosité parmi les polymères hydrophiles tels que les éthers et esters de glycol, les poloxamers comme les Lutrol®, les poly(aminosaccharides) comme les Chitines ou Chitosans, les poly(saccharides) comme le Dextran et les dérivés de la cellulose comme les Carbopol®.

De préférence, l'agent de viscosité est un poloxamer: polymère séquencé de polyéthylène-polypropylène. Le noyau central hydrophobe est constitué par le polypropylène et entouré par des séquences hydrophiles de

polyéthylène. De préférence on utilisera le poloxamer 188 (Lutrol® F68, BASF) qui forme des gels à des concentrations comprises entre 50 et 60% dans l'eau.

La quantité d'agent à mettre en œuvre est fonction de la viscosité à atteindre. D'une manière préférée, la concentration en poloxamer est toutefois 5 inférieure à 50 % en masse de manière à éviter la formation d'un gel.

La combinaison des agents stabilisants avec les agents de viscosité revêt une importance toute particulière dans la mesure où on a montré que le succès de l'étape de cisaillement laminaire dépendait pour une grande part du rapport 10 des viscosités entre la phase dispersée et la phase continue. La combinaison de ces agents permet alors à la fois l'obtention aisée du rapport de viscosité optimal entre les phases ainsi qu'une stabilité de l'émulsion vis-à-vis de la coalescence des gouttes.

La phase aqueuse de l'émulsion peut comprendre tout autre agent ou 15 additif habituellement présent dans les formulations pharmaceutiques, tels que des conservateurs, agents tampons.

En particulier, la phase aqueuse interne peut comprendre également au moins un autre principe actif, en particulier hydrosoluble.

Ainsi, on peut combiner un principe actif hydrophile et lipophile en 20 solubilisant le premier dans la phase aqueuse interne et le second dans la phase organique de polymère.

Enfin, la ou les phases aqueuses de l'émulsion sont de préférence saturées en solvant organique pour éviter une diffusion de celui-ci depuis la phase organique vers ces phases.

25 Comme décrit ci-dessus, les microsphères peuvent être préparées à partir d'une émulsion double, dans laquelle une deuxième phase aqueuse (dite « interne ») est dispersée dans la phase organique polymère.

La phase aqueuse interne de l'émulsion double peut contenir les agents déjà mentionnés ci-dessus au sujet de la phase aqueuse externe.

30 La phase aqueuse interne des émulsions doubles peut toutefois également contenir au moins une protéine, à titre d'agent tensioactif, et/ou d'agent de viscosité et/ou à titre de principe actif.

Ainsi, elle peut contenir une protéine de haut poids moléculaire telle que la SAH (Serum Albumine Humaine) afin d'augmenter la viscosité et/ou pour stabiliser l'émulsion. En effet, on a remarqué que le caractère amphiphile de telles macromolécules pouvait contribuer à stabiliser l'émulsion. D'une manière 5 préférée, la phase aqueuse interne comprend la SAH ou au moins une protéine à des concentrations comprises entre 0,01 % et 10 % en poids par rapport au poids de la phase aqueuse interne, de préférence entre 0,1 et 2%

Lorsque la phase aqueuse interne comprend une protéine, il est alors généralement préférable d'ajouter d'autres additifs afin de constituer un milieu 10 adapté à la protéine d'intérêt, en particulier pour ce qui concerne le pH. La présence d'un agent tampon d'un pH proche du pH<sub>i</sub> de la protéine permet avantageusement la conservation de la conformation naturelle de la protéine.

La phase aqueuse interne des émulsions doubles peut donc en outre contenir les composés nécessaires pour former un tampon stabilisant le pH de 15 la solution. Les valeurs de pH adaptées pour les différentes protéines et les tampons correspondants sont connus par l'homme du métier et ne seront donc pas détaillés ici.

La phase aqueuse interne peut également contenir des agents 20 stabilisants tels que le poloxamer 188 décrit par SANCHEZ, A. *et al.* (Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon alpha. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2003) 18, 221-229).

La phase aqueuse interne contient avantageusement également un co-tensioactif. Celui-ci, combiné à la protéine, va se concentrer à l'interface phase aqueuse interne/phase organique et contribuer à diminuer la tension de surface 25 entre ces deux milieux.

Le co-tensioactif utilisé sera de préférence le Solutol HS 15 de chez BASF. Ce produit est un mélange de mono- et diesters d'acide 12-hydroxystéarique de polyéthylène glycol 660. Il est soluble dans l'eau, l'éthanol et le 2-propanol.

30 La phase aqueuse interne comprend un tensioactif à une concentration de 0,01 à 10%, de préférence 0,05 à 1, et tout particulièrement de 0,1 à 0,2 % en poids par rapport au poids de la phase aqueuse interne.

La phase aqueuse interne des microsphères peut en outre avantageusement contenir un principe actif.

Cela se révèle particulièrement intéressant pour l'administration de principes actifs hydrophiles fragiles tels que des protéines ou des polypeptides 5 par exemple. En effet, on observe souvent une altération de l'activité biologique de ces composés lors d'un changement d'environnement chimique comme par exemple la dispersion dans un solvant organique, ou en cas de variations de température, ou de pH.

Or, dans la préparation des microsphères, le principe actif ne subira 10 aucune altération de son activité puisqu'il sera solubilisé dans la phase aqueuse interne d'une émulsion double au pH optimal. On réduit ainsi les changements d'environnement physico-chimique et de ce fait les altérations structurelles de la molécule, ce qui permet de conserver l'activité du principe actif.

15 Le procédé de préparation des microsphères comporte ensuite une deuxième étape consistant à soumettre l'émulsion obtenue à un cisaillement laminaire. Le cisaillement laminaire est réalisé de préférence dans un dispositif de Couette. C'est la viscoélasticité de l'émulsion obtenue grâce à un rapport des viscosité optimal entre les phases en présence, la vitesse de rotation du 20 rotor ainsi que la vitesse d'injection de l'émulsion dans l'entrefer qui vont définir la taille et l'uniformité de taille des microsphères obtenues.

Le procédé de préparation des microsphères comporte ensuite une troisième étape consistant à extraire le solvant organique de la solution de polymère dispersée.

25 Cette étape peut être réalisée par tout procédé connu de l'homme du métier, par exemple évaporation sous l'effet de la chaleur ou sous vide.

Selon un mode de réalisation préféré, elle est réalisée par extraction du solvant organique dans l'eau. Plus concrètement, on ajoute à l'émulsion monodisperse préparée une grande quantité d'eau dans laquelle le solvant 30 organique va diffuser. Ce mode de réalisation a notamment l'avantage de protéger le principe actif encapsulé de variations de température ou de pression.

A mesure que le solvant disparaît de la phase organique par diffusion dans l'eau, le polymère précipite et forme, suivant le type d'émulsion de départ, des microsphères à matrice polymérique retenant des gouttelettes de solution aqueuse (émulsion double), ou pleines (émulsion simple).

5 La précipitation a lieu de préférence sous faible agitation de façon à conserver l'homogénéité de l'émulsion et de la suspension.

Enfin, dans une dernière étape, les microsphères peuvent être recueillies par des moyens habituels, par exemple par filtration de la solution.

Le cas échéant, celles-ci peuvent ensuite être lyophilisées en présence 10 de cryoprotecteur. Parmi les agents cryoprotecteurs, on peut citer notamment les polyols et les électrolytes. En particulier, conviennent par exemple la glycérine, le mannose, le glucose, le fructose, le xylose, le tréhalose, le mannitol, sorbitol, xylidine et autres polyols, et le polyéthylène glycol. A titre d'électrolyte, on peut citer le chlorure de sodium.

15 Ainsi, les microsphères préparées peuvent servir à véhiculer un ou plusieurs principes actifs, notamment hydrophiles et lipophiles, en permettant leur libération homogène et déterminée dans le temps.

L'invention sera décrite plus en détail dans les exemples et figures qui suivent, lesquelles montrent :

20

Fig. 1 : Vue schématique d'un dispositif Couette ;

Fig. 2 : Photographies de microscopie optique de microsphères préparées selon l'exemple 2 (a) avant extraction (objectif x100) ; (b) après séchage et redispersion (objectif x40) ; (c) leur distribution granulométrique après redispersion ;

25

Fig. 3 : Photographies de microscopie optique de microsphères de polymère selon l'exemple 3 (a) avant extraction (objectif x40); (b) après extraction (objectif x40); (c) leur distribution granulométrique après redispersion ;

30

Fig. 4 : Photographies de microscopie optique d'une émulsion inverse selon l'exemple 5 (a) avant cisaillement (objectif x10); (b) après cisaillement à 600 rpm sur l'appareil de Couette (objectif x10);

Fig. 5 : Distribution granulométrique de microsphères obtenues (a) selon l'exemple 7, par cisaillement aléatoire standard (agitateur à pales) ; (b) selon l'exemple 6, par cisaillement laminaire (appareil de Couette).

5

## EXEMPLES

### EXEMPLE 1

10 Procédure générale de préparation de microsphères à partir d'une

#### émulsion simple :

Ce procédé peut être utilisé pour préparer des microsphères de polymère biodégradables, utiles notamment pour la délivrance de principes actifs lipophiles.

15 Le principe actif à encapsuler est dispersé ou solubilisé dans une phase organique composée d'un PLGA dissous dans de l'acétate d'éthyle.

Cette phase organique est ensuite émulsionnée dans une phase aqueuse contenant de l'eau et un tensioactif hydrophile tel que le PVA, entre 0,1 et 10%, de préférence entre 1 et 4% et un agent de viscosité tel qu'un polyéthylène glycol ou un poloxamer entre 10 et 50%.

20 Le rapport des viscosités des deux phases est réglé afin d'optimiser l'efficacité du cisaillement. De préférence, le rapport entre la viscosité de la phase organique et celle de la phase aqueuse est compris entre 0,1 et 10, plus précisément entre 3 et 8.

25 Ensuite, l'émulsion ainsi obtenue, dite « grossière » est soumise à un cisaillement laminaire. De préférence, cette étape est réalisée dans un dispositif de Couette, présenté figure 1. Le cisaillement contrôlé permet de rendre les gouttes de phase dispersée monodisperses ; il permet cependant aussi de contrôler leur taille.

30 De préférence, le cisaillement contrôlé est réalisé en mettant l'émulsion en contact avec une surface solide en mouvement, le gradient de la vitesse caractérisant l'écoulement de l'émulsion étant constant dans une direction perpendiculaire à la surface solide en mouvement. Un tel cisaillement peut être

réalisé par exemple dans une cellule constituée de deux cylindres concentriques en rotation l'un par rapport à l'autre, telle qu'une cellule « Couette ».

Un dispositif de Couette (1) est représenté à la figure 1. Il comporte un rotor (2), un stator (3) et un piston (4). On introduit l'émulsion dans l'espace 5 défini entre le rotor et le stator ,désigné comme entrefer, par le biais d'une seringue d'injection (5). L'émulsion cisaillée entre le rotor et le stator est ensuite recueillie à la sortie dans une coupelle (6) de récupération dans un flacon hermétique. La vitesse de cisaillement, la largeur de l'entrefer et la vitesse 10 d'injection sont des paramètres réglables qu'on peut faire varier en fonction de la taille des microsphères souhaitée.

Pour les détails de ce procédé, voir notamment les demandes WO 97/38787, FR 2767064 et WO0185319.

Une fois l'émulsion rendue ainsi monodisperse, on peut procéder à l'extraction du solvant pour précipiter les microsphères. L'extraction se fait par 15 ajout d'un volume d'eau calculé en fonction de la solubilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau et de la quantité d'émulsion obtenue. On utilise de préférence un volume d'eau égal à au moins deux fois le volume minimal nécessaire à la solubilisation de l'acétate d'éthyle.

Dans la mesure où l'acétate d'éthyle est plus soluble dans l'eau à froid, 20 on procède à une seconde étape d'extraction à froid pour éliminer les résidus de solvant. Ainsi, après 30 minutes d'agitation, un second volume d'eau déminéralisée refroidi à 5°C est ajouté et l'ensemble est maintenu sous agitation pendant à nouveau 30 minutes. L'extraction du solvant ainsi réalisée est quasi totale.

25 A l'issue des 30 minutes, les microsphères sont ensuite séparées du milieu d'extraction par filtration sous pression sur filtre Nylon de porosité 0,45 µm. Le gâteau récupéré est rincé 3 fois par 1L d'eau déminéralisée. Puis les microsphères sont laissées à sécher une nuit à température ambiante ou bien congelées et lyophilisées après addition d'un agent cryoprotecteur.

30 Une fois sèches, les microsphères sont redispersées dans une solution de tensioactif Montanox® 20 ou 80 (BASF) à 1% (Montanox® 80 : polysorbate monooléate et Montanox® 20 : polysorbate monolaurate) par agitation et

passage dans un bain à ultrasons. Les microsphères redispersées sont caractérisées par observation au microscope et leur distribution de taille est mesurée par granulométrie laser.

5

## EXEMPLE 2

### Préparation de microsphères de 2,5µm à partir d'une émulsion simple :

Dans un flacon, on prépare la phase aqueuse continue par solubilisation à 70°C de 0,9g de PVA dans 14,14g d'eau déminéralisée saturée en acétate d'éthyle (3%) sous agitation magnétique. Après refroidissement, 15g de PEG 10 400 y est incorporé. Cette phase aqueuse contient donc 3% de PVA, 50% de PEG 400 et est saturée en acétate d'éthyle.

La phase organique est préparée dans un flacon hermétique par dissolution sous agitation magnétique de 2,6g de PLGA 75/25 dans 17,39g d'acétate d'éthyle saturé en eau (3%). Cette phase organique contient donc 15 13% de PLGA solubilisé dans de l'acétate d'éthyle saturé en eau.

La totalité de cette phase organique est ensuite émulsionnée dans 20g de la phase aqueuse ci-dessus par agitation manuelle à la spatule. L'émulsion contient 50% en masse de phase organique dispersée.

Le prémélange ainsi obtenu est ensuite placé dans l'appareil de Couette 20 et cisaillé à une vitesse de 400 rpm dans un entrefer de 100 µm avec une vitesse de montée du piston de 0,7 qui correspond à un débit d'environ 7mL/min. Le diamètre du rotor est de 2 cm. On voit sur figure 2(a) la distribution de taille homogène de l'émulsion ainsi préparée.

Une fois l'émulsion rendue ainsi monodisperse, on procède à l'extraction 25 du solvant, la filtration puis le séchage des microsphères, comme expliqué à l'exemple 1. La figure 2(b) montre l'aspect visuel régulier des microsphères obtenues, après redispersion comme décrit à l'exemple 1.

La distribution de taille des microsphères est mesurée par granulométrie laser (voir figure 2(c)), elle est centrée sur 2,5µm.

**EXEMPLE 3****Préparation de microsphères de 6,5µm à partir d'une émulsion simple :**

Dans un flacon, on prépare la phase aqueuse continue par solubilisation à 70°C de 1,2g de PVA dans 35,25g d'eau déminéralisée saturée en acétate d'éthyle (3%) sous agitation magnétique. Après refroidissement, 4,02g de PEG 2000 y est incorporé. Cette phase aqueuse contient donc 3% de PVA, 10% de PEG 2000 et est saturée en acétate d'éthyle.

La phase organique est préparée dans un flacon hermétique par dissolution sous agitation magnétique de 2,67g de PLGA 75/25 dans 17,89g d'acétate d'éthyle saturé en eau (3%). Cette phase organique contient donc 13% de PLGA solubilisé dans de l'acétate d'éthyle saturé en eau.

La totalité de cette phase organique est ensuite émulsionnée dans 20g de la phase aqueuse ci-dessus par agitation manuelle à la spatule. L'émulsion contient 50% en masse de phase organique dispersée.

Le prémélange ainsi obtenu est ensuite placé dans l'appareil de Couette et cisaillé à une vitesse de 300 rpm dans un entrefer de 100 µm avec une vitesse de montée du piston de 0,7 qui correspond à un débit d'environ 7mL/min. Le diamètre du rotor est de 2 cm. On voit sur figure 3(a) la distribution de taille homogène de l'émulsion ainsi préparée.

Une fois l'émulsion rendue ainsi monodisperse, on procède à l'extraction du solvant, la filtration puis le séchage des microsphères, comme expliqué à l'exemple 1. La figure 3(b) montre l'aspect régulier des microsphères après extraction du solvant comme décrit à l'exemple 1.

La distribution de taille des microsphères est mesurée par granulométrie laser (voir figure 3(c)), elle est centrée sur 6,5µm.

**EXEMPLE 4****Procédure générale de préparation de microsphères à partir d'une émulsion double :**

Ce procédé est employé pour la préparation de microsphères polymériques utiles notamment pour la délivrance de principes actifs

hydrophiles ou une combinaison d'un principe actif hydrophile avec un principe actif lipophile

On prépare tout d'abord une émulsion inverse (E/H), en dispersant une phase aqueuse dite « interne » dans une phase organique comprenant une 5 solution de polymère (PLGA 75/25, par exemple).

Le rapport des viscosités des deux phases, pour l'émulsion inverse, est réglé afin d'optimiser l'efficacité du cisaillement. De préférence, le rapport entre la viscosité de la phase aqueuse interne et celle de la phase organique est compris entre 0,1 et 10, plus précisément entre 0,1 et 0,3.

10 La phase aqueuse interne contient une protéine, notamment la SAH entre 0,01 et 10%, de préférence entre 0,1 et 2%, un co-tensioactif, notamment le Solutol® HS15 entre 0,01 et 10%, de préférence entre 0,05 et 1% et un sel, notamment le chlorure de sodium entre 0,1 et 20%, préférentiellement 0,6%.

15 La phase organique est préparée dans un flacon hermétique par dissolution sous agitation magnétique de PLGA 75/25 entre 5 et 30%, préférentiellement à 20% dans une solution d'acétate d'éthyle saturé en eau (3%).

Généralement, le principe actif hydrophile à encapsuler est contenu dans la phase aqueuse interne et le principe actif lipophile dans la phase organique.

20 L'émulsion inverse « grossière » est alors soumise à un cisaillement comme décrit à l'exemple 1 afin d'obtenir une phase dispersée de taille et de répartition contrôlée. L'étape de cisaillement contrôlé peut être réalisée à l'aide d'un dispositif de Couette ou dans un dispositif turbulent de type Ultra-Turrax.

25 Dans un flacon, une solution aqueuse de PVA entre 0,01 et 10%, de préférence entre 1 et 4% est portée à 70°C sous agitation magnétique. Après refroidissement, on ajoute à la solution (phase aqueuse externe) le Lutrol® F68 entre 0,1 et 40%, de préférence entre 1 et 10% et du NaCl à une concentration identique à celle de la phase aqueuse interne : 0.6%.

30 Ensuite, cette phase aqueuse dite « externe » est saturée en solvant organique, préférentiellement l'acétate d'éthyle, ce qui représente pour ce solvant particulier une concentration d'environ 3% en poids par rapport au poids de la phase aqueuse.

Ensuite, on incorpore l'émulsion inverse dans la phase aqueuse externe décrite ci-dessus. Cette étape peut être réalisée manuellement à l'aide d'une spatule.

Le rapport des viscosités des deux phases, dans le cas de l'émulsion 5 double, est réglé afin d'optimiser l'efficacité du cisaillement. De préférence, le rapport entre la viscosité de la phase organique et celle de la phase aqueuse externe est compris entre 0,1 et 10, plus précisément entre 3 et 8.

L'émulsion ainsi obtenue est aussi appelée « prémélange » ou émulsion « grossière » dans la mesure où la phase dispersée est constituée de 10 gouttelettes de taille importante et très variable.

L'émulsion « grossière » est alors soumise à un cisaillement comme décrit à l'exemple 1 afin d'obtenir une phase dispersée de taille et de répartition contrôlée. L'étape de cisaillement contrôlé peut être réalisée à l'aide d'un dispositif de Couette.

15 Une fois l'émulsion rendue ainsi monodisperse, on procède à l'extraction du solvant pour précipiter les microsphères. L'extraction se fait par ajout d'un volume d'eau calculé en fonction de la solubilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau et de la quantité d'émulsion obtenue. On utilise de préférence un volume d'eau égal à au moins deux fois le volume minimal nécessaire à la solubilisation de 20 l'acétate d'éthyle.

Dans la mesure où l'acétate d'éthyle est plus soluble dans l'eau à froid, on procède à une seconde étape d'extraction à froid pour éliminer les résidus de solvant. Ainsi, après 30 minutes d'agitation, un second volume d'eau déminéralisée refroidi à 5°C est ajouté et l'ensemble est maintenu sous agitation 25 pendant à nouveau 30 minutes. L'extraction du solvant ainsi réalisée est quasi totale.

Les microsphères monodispersées contenant le ou les principes actifs sont filtrées et lyophilisées comme décrit à l'exemple 1.

Une fois sèches, les microsphères sont redispersées dans une solution 30 de tensioactif Montanox® 20 ou 80 (BASF) à 1% (Montanox® 80 : polysorbate monooléate et Montanox® 20 : polysorbate monolaurate) par agitation et passage dans un bain à ultrasons. Les microsphères redispersées sont

caractérisées par observation au microscope et leur distribution de taille est mesurée par granulométrie laser.

### **EXAMPLE 5**

5        Préparation d'une émulsion inverse de 1µm :

Dans un flacon, on prépare la phase aqueuse interne sous agitation magnétique. Elle est composée de 0,04g de SAH, de 0,0036g de Solutol® HS15 et de 0,022g de NaCL solubilisés dans 4g de tampon citrate pH5 saturé en acétate d'éthyle (3%). Cette phase aqueuse interne contient donc 1% de 10 SAH, 0,1% de Solutol® HS15 et est saturée en acétate d'éthyle.

La phase organique est préparée dans un flacon hermétique par dissolution sous agitation magnétique de 3,2 g de PLGA 75/25 dans 12,82 g d'acétate d'éthyle saturé en eau (3%). Cette phase organique contient donc 20% de PLGA solubilisé dans de l'acétate d'éthyle saturé en eau.

15        On disperse manuellement à la spatule la phase aqueuse interne dans la solution d'acétate d'éthyle pour obtenir une émulsion inverse grossière.

Cette émulsion contient 20 % en poids de phase aqueuse interne par rapport à son poids total. La stabilité de l'émulsion grossière réalisée est vérifiée avant cisaillement par l'absence de déphasage et de coalescence.

20        Le prémélange ainsi obtenu est ensuite placé dans l'appareil de Couette et cisaillé à une vitesse de 400 rpm dans un entrefer de 100 µm avec une vitesse de montée du piston de 0,7 qui correspond à un débit d'environ 7mL/min. Le diamètre du rotor est de 2 cm. L'émulsion inverse est stable après cisaillement à l'appareil de Couette.

25        L'aspect visuel au microscope du prémélange et de l'émulsion après cisaillement sur l'appareil de Couette est présenté sur la figure 4(a) et (b).

L'émulsion double calibrée est ensuite préparée comme suit.

### **EXAMPLE 6**

30        Préparation de microsphères monodisperses de 28µm à partir d'une émulsion double :

On prépare d'abord une émulsion inverse comme à l'exemple 5 avec :

- 20% de PLGA dans l'acétate d'éthyle ;
- 1% de SAH dans la phase aqueuse interne,
- 0,1% de Solutol® HS15,
- 0,6% de NaCl dans la phase aqueuse interne.

5

L'émulsion inverse grossière obtenue est ensuite cisaillée à l'Ultra-turrax (puissance 24000) pendant 3 minutes ou bien dans le dispositif de Couette à 400 rpm.

On incorpore alors à la spatule 20g d'émulsion inverse obtenue dans une 10 même quantité de phase aqueuse externe composée de 3g de Lutrol® F68, 0,9g de PVA et 0,18% de NaCl. Cette phase aqueuse externe contient donc 10% de Lutrol® F68, 3% de PVA et 0,6% de NaCl et est saturée en acétate d'éthyle. Cette émulsion double contient 50 % en poids d'émulsion inverse par rapport à son poids total.

15 Le prémélange ainsi obtenu est ensuite placé dans l'appareil de Couette et cisaillé à une vitesse de 100 rpm dans un entrefer de 100 µm avec une vitesse de montée du piston de 0,7 qui correspond à un débit d'environ 7mL/min. Le diamètre du rotor est de 2 cm.

20 L'émulsion double recueillie en sortie de l'appareil est diluée sous agitation dans 250 mL d'eau salée (0,6% NaCl) à température ambiante.

Après 10 minutes, on ajoute un second volume de 250 mL d'eau salée à 25 5°C, et on poursuit l'agitation pendant 10 minutes. On observe la transformation des globules doubles en microsphères solides. Les microsphères sont ensuite séparées du milieu d'extraction par filtration sous pression sur filtre Nylon de porosité 0,45 µm. Le gâteau récupéré est rincé 3 fois par 1L d'eau déminéralisée.

30 Pour la lyophilisation, les microsphères filtrées sont dispersées dans une solution de tréhalose. Le pourcentage de tréhalose ajouté correspond à 5% des microsphères à lyophiliser. L'échantillon est d'abord congelé dans l'azote liquide, puis stocké au congélateur à -24°C. La lyophilisation se fait selon la rampe suivante avec un vide fixé à 0,12 mbar:

- Dessication primaire par passage de -44°C à -10°C en 4 heures et isotherme à -10°C pendant 15h30.
- Dessication secondaire par passage de -10°C à +10°C en 30 minutes et retour à température ambiante en 30minutes.

5

Une fois sèches, les microsphères sont redispersées dans une solution de tensioactif Montanox® 20 ou 80 (BASF) à 1% (Montanox® 80 : polysorbate monooléate et Montanox® 20 : polysorbate monolaurate) par agitation et passage dans un bain à ultrasons. Les microsphères redispersées sont 10 caractérisées par observation au microscope et leur distribution de taille est mesurée par granulométrie laser. La distribution de taille des microsphères est centrée sur 28µm (figure 5b).

### EXAMPLE 7

15

#### Préparation de microsphères par cisaillement turbulent :

On a préparé un lot de microsphères selon l'exemple 6, en utilisant un cisaillement en régime turbulent (Ultra-turrax puis agitation à pâles) en remplacement du cisaillement laminaire engendré par l'appareil de Couette.

20

La distribution de taille de ces microsphères a été évaluée par un granulomètre au laser (figure 5a) et comparée à celle établie pour les microsphères préparées selon l'exemple 6 (figure 5b).

25

On constate aisément que le cisaillement laminaire tel que dispensé par le dispositif de Couette permet l'obtention d'une distribution de taille plus étroite et de ce fait un caractère monodisperse plus prononcé. De ce fait, on contrôle mieux la cinétique de libération des principes actifs contenus dans les microsphères.

**REVENDICATIONS**

1. Procédé de préparation de microsphères biodégradables monodisperses comprenant les étapes de :

5                   a) préparation d'une émulsion comportant au moins une phase polymérique, laquelle comprend un principe actif, et au moins une phase aqueuse, la viscosité de la phase organique et de la phase aqueuse présentant un ratio de 0,1 à 10 ;

10                b) soumission de l'émulsion obtenue à un cisaillement laminaire contrôlé ;

                  c) élimination du solvant de la phase polymérique ; et

                  d) isolement des microsphères ainsi obtenues.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les microsphères sont majoritairement constituées d'un polymère biodégradable.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel le polymère biodégradable est choisi parmi les poly( $\alpha$ -hydroxy)acides, les polyesters aliphatiques des poly( $\alpha$ -hydroxy-acides), des poly( $\epsilon$ -caprolactones)-PCL, des polydioxanones – PDO, 20 les polyorthoesters, les polyanhydrides, les polycyano-acrylates, les polyuréthannes, les polypeptides ou poly(amino-acides), les polysaccharides modifiés, la cellulose, les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes et les poly(vinyl-acétates) et leurs dérivés et copolymères.

25                4. Procédé selon l'une des revendications 2 à 3, dans lequel le polymère biodégradable est choisi parmi les polyacides lactiques (PLA), les copolymères d'acide polylactique / acide polyglycolique (PLGA).

30                5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel le polymère présente un poids moléculaire compris entre 50 et 500 kDaltons.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le solvant organique de la phase organique de l'émulsion est l'acétate d'éthyle .
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel le principe actif est 5 liposoluble.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel le principe actif est hydrosoluble.
- 10 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, dans lequel le principe actif est un peptide ou une protéine.
- 15 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, dans lequel l'émulsion préparée à l'étape (a) comprend un principe actif hydrophile en combinaison avec un principe actif lipophile.
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, dans lequel la phase organique de l'émulsion représente 10 à 60 % en poids par rapport au poids total de l'émulsion.
- 20 12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, dans lequel la phase organique de l'émulsion comprend entre 1 et 50 %, préférentiellement entre 5 et 30 % en poids de polymère.
- 25 13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel la phase organique de l'émulsion comprend entre 1 et 50 %, préférentiellement entre 5 et 30 % en poids de principe actif.
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel l'émulsion est 30 une émulsion double.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, dans lequel la phase aqueuse externe et/ou interne de l'émulsion contient au moins un agent stabilisant et/ou au moins un agent de viscosité.

5 16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel la phase aqueuse externe et/ou interne de l'émulsion contient au moins un agent stabilisant et/ou au moins un agent d'osmolarité et/ou au moins un agent tensioactif et/ou au moins un agent tampon.

10 17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, dans lequel l'étape de calibration par cisaillement laminaire est réalisée dans un dispositif de Couette.

15 18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, dans lequel l'étape de l'élimination du solvant de la phase polymérique est réalisée par extraction dans l'eau.

20 19. Utilisation des microsphères susceptibles d'être obtenues selon l'une des revendications 1 à 18, pour l'administration de principes actifs dans l'organisme humain ou animal.

25 20. Utilisation selon la revendication 19, dans laquelle le principe actif est choisi parmi les antibiotiques, hypolipidémiants, antihypertenseurs, agents antiviraux, betabloqueurs, bronchodilatateurs, cytostatiques, agents psychotropes, hormones, vasodilatateurs, anti-allergiques, antalgiques, antipyrétiques, antispasmodiques, anti-inflammatoires, anti-angiogéniques, antibactériens, anti-ulcériens, antifongiques, anti-parasitaires, antidiabétiques, antiépileptiques, antiparkinsoniens, antimigraineux, anti-Alzheimer, antiacnéiques, antiglaucomateux, antiasthmatiques, neuroleptiques, antidépresseurs, anxiolytiques, hypnotiques, normothymiques, sédatifs, psychostimulants, anti-30 ostéoporoses anti-arthritiques, anticoagulants, antipsoriasis, hyperglycémiants, orexigènes, anorexigènes, antiasthéniques, anti-constipation, anti-diarrhéiques, anti-traumatiques, diurétiques, myorelaxants, médicaments de l'énurésie,

médicaments des troubles de l'érection, vitamines, peptides, protéines, anticancéreux, acides nucléiques, ARN, oligonucléotides, ribozymes et l'ADN.

1/5

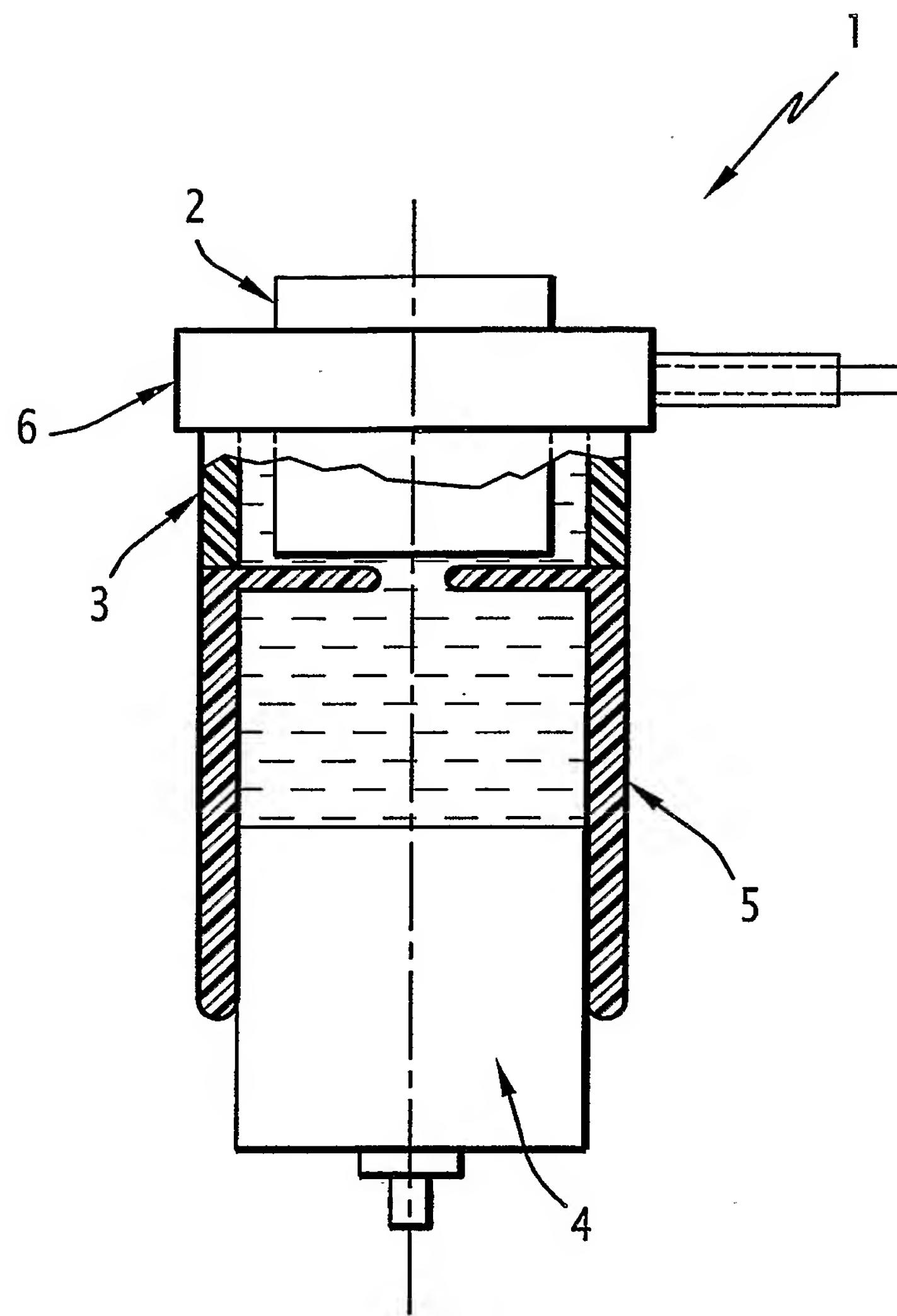
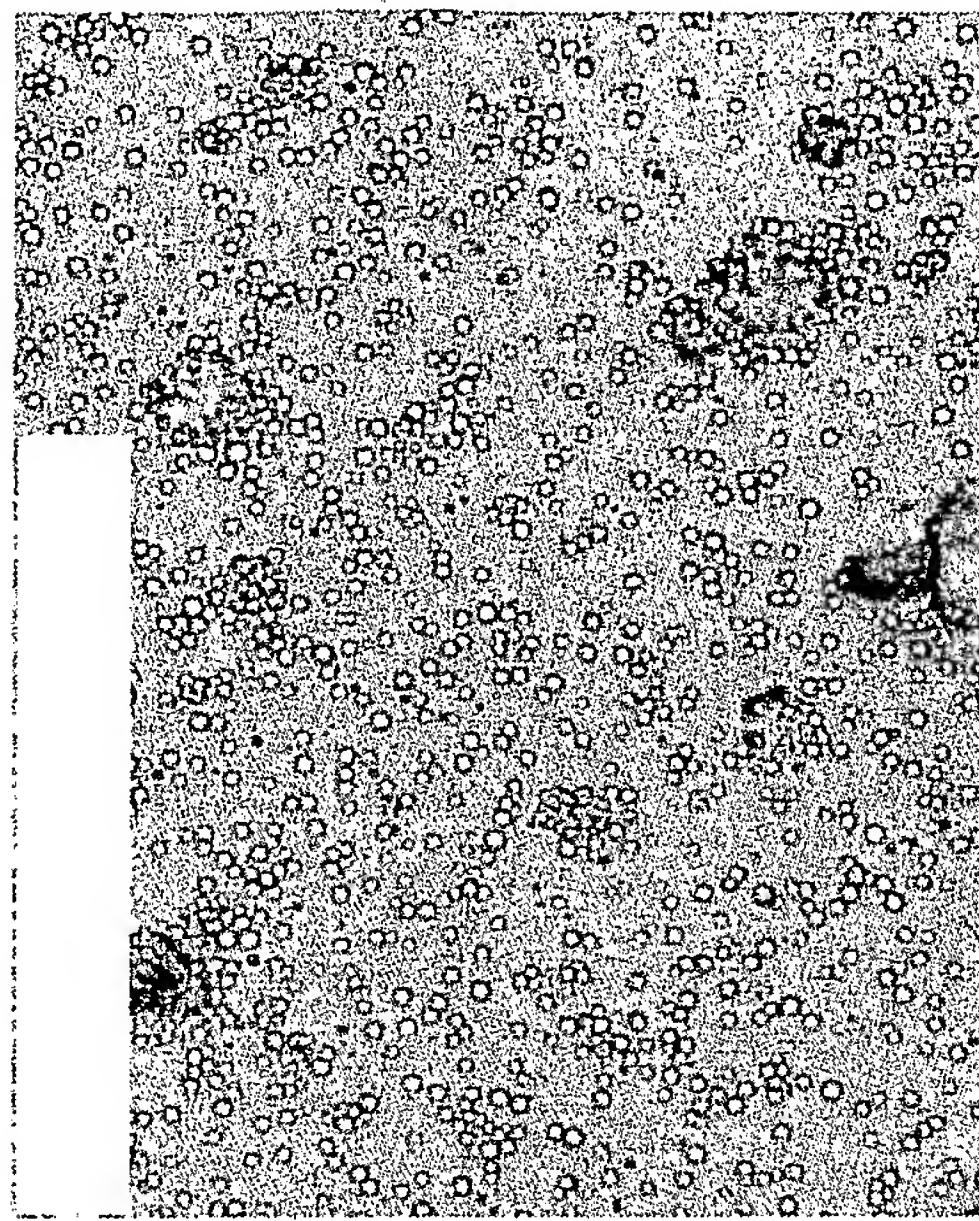
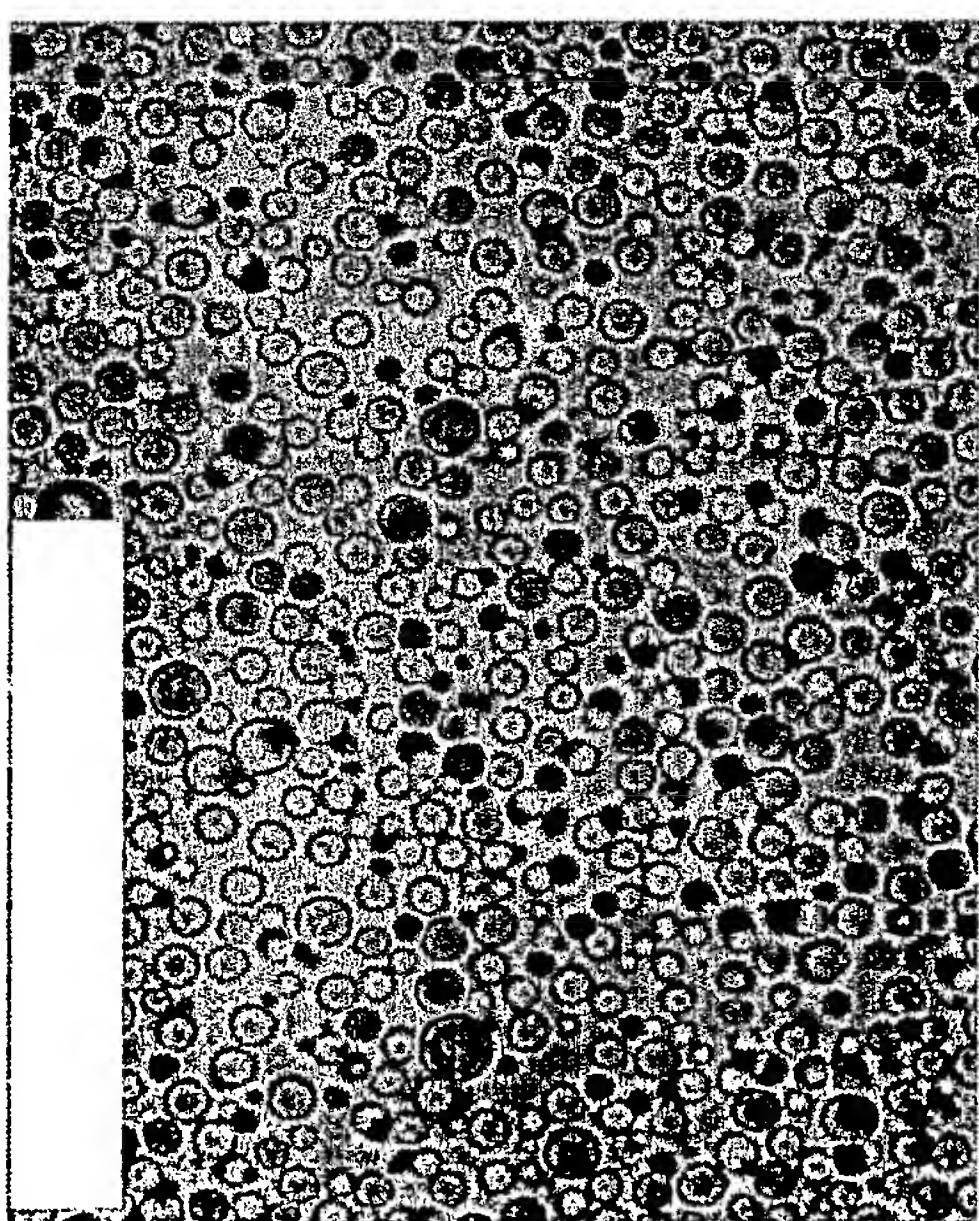


FIG.1

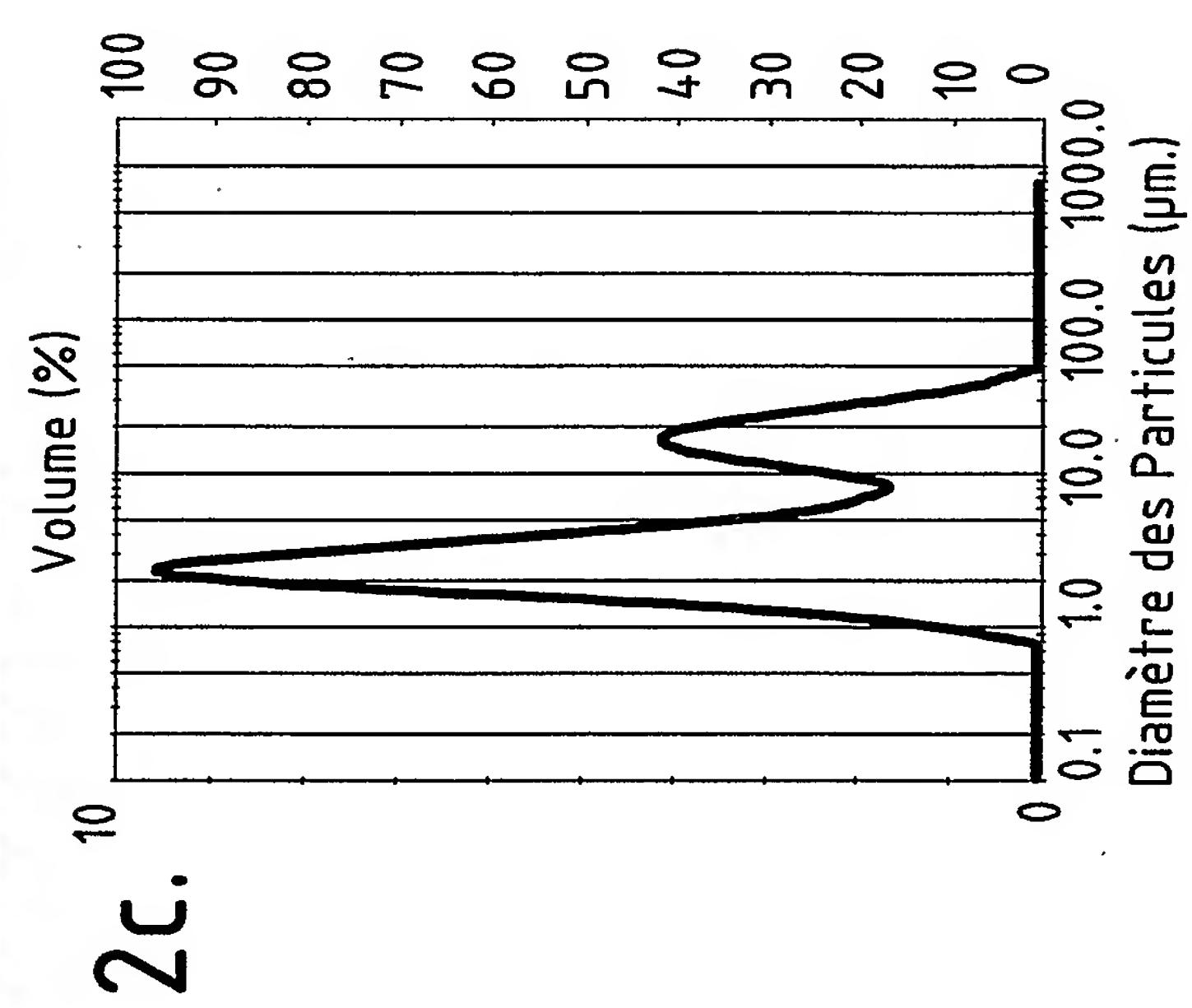
2/5



2b.



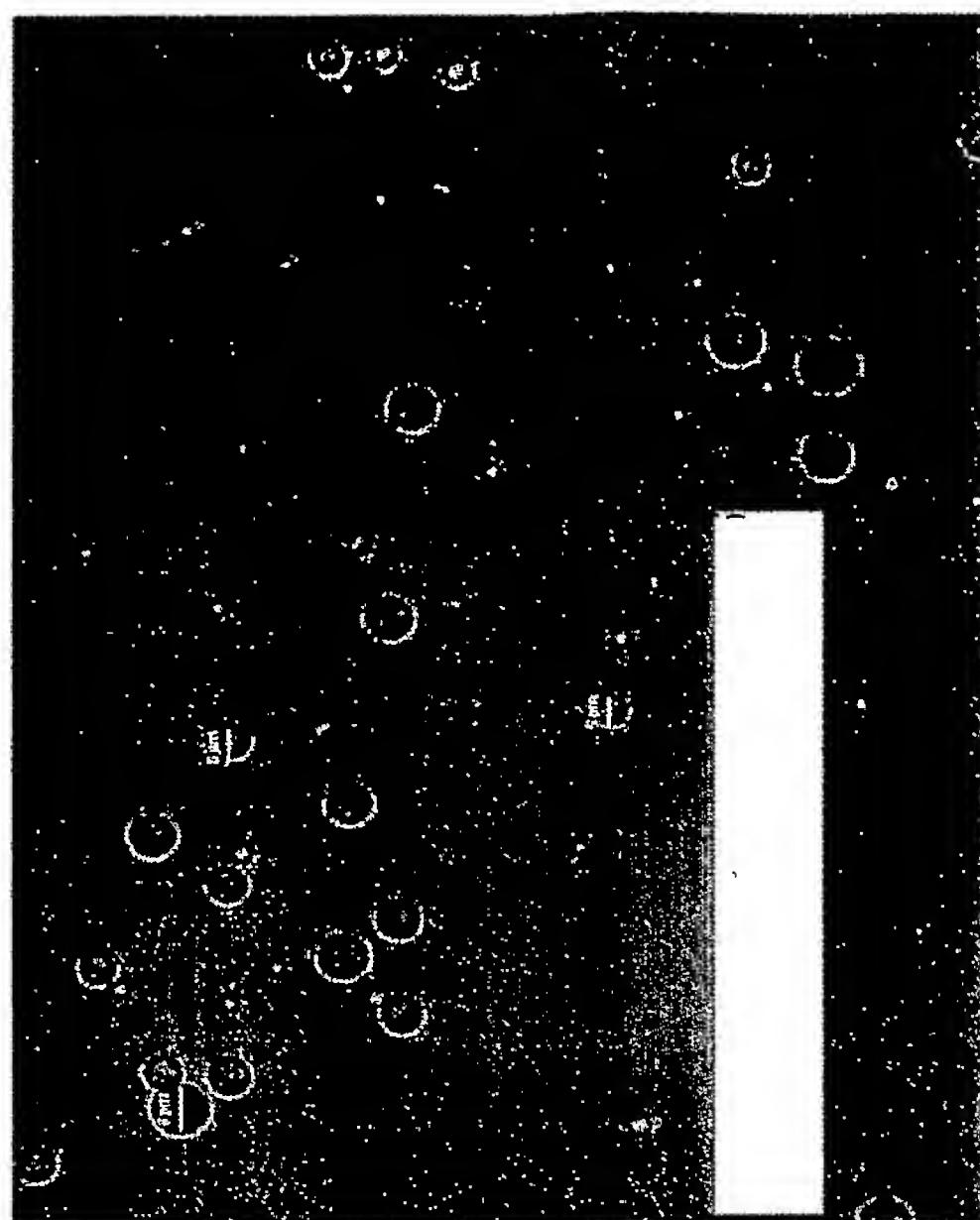
2a.



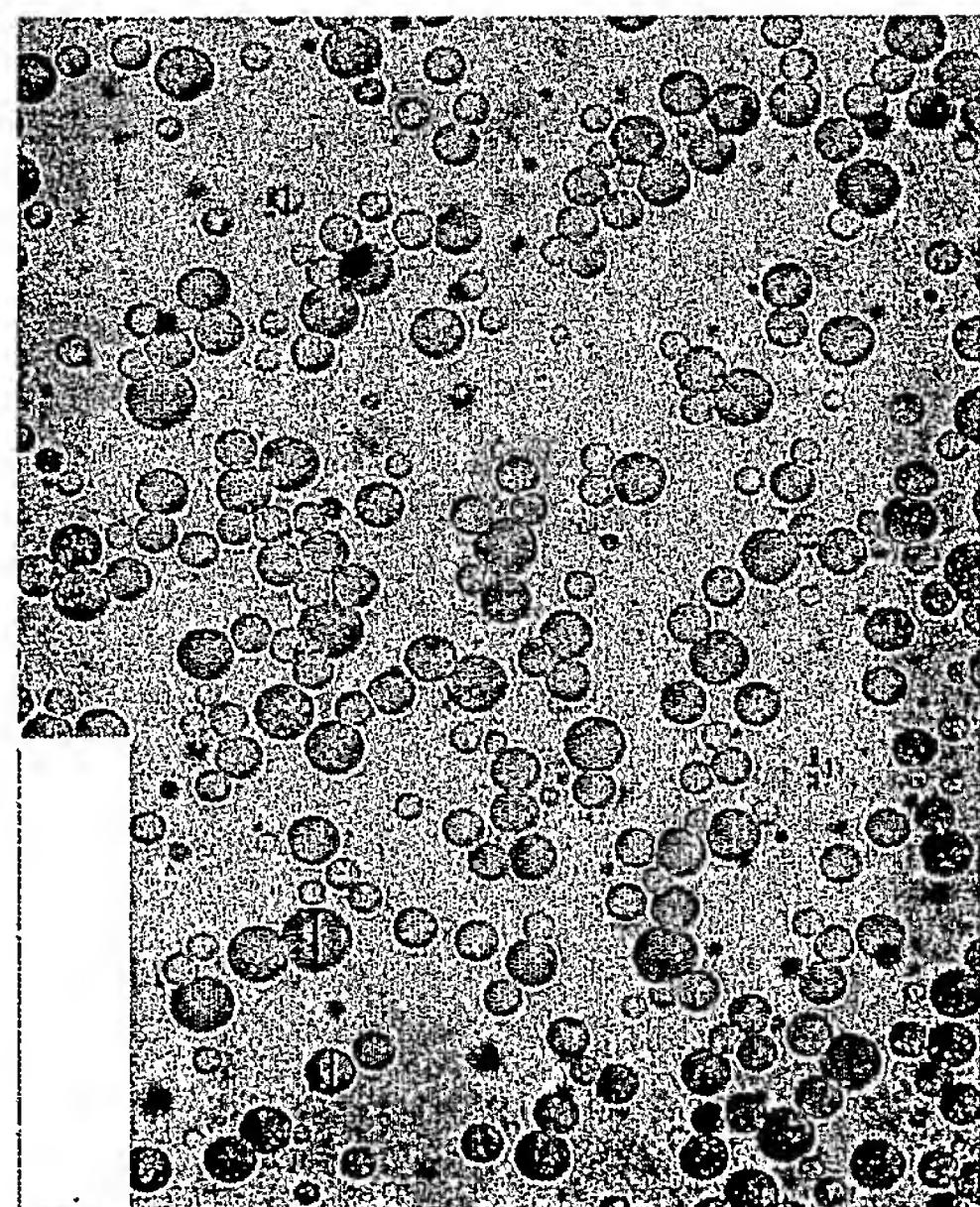
2c.

FIG. 2

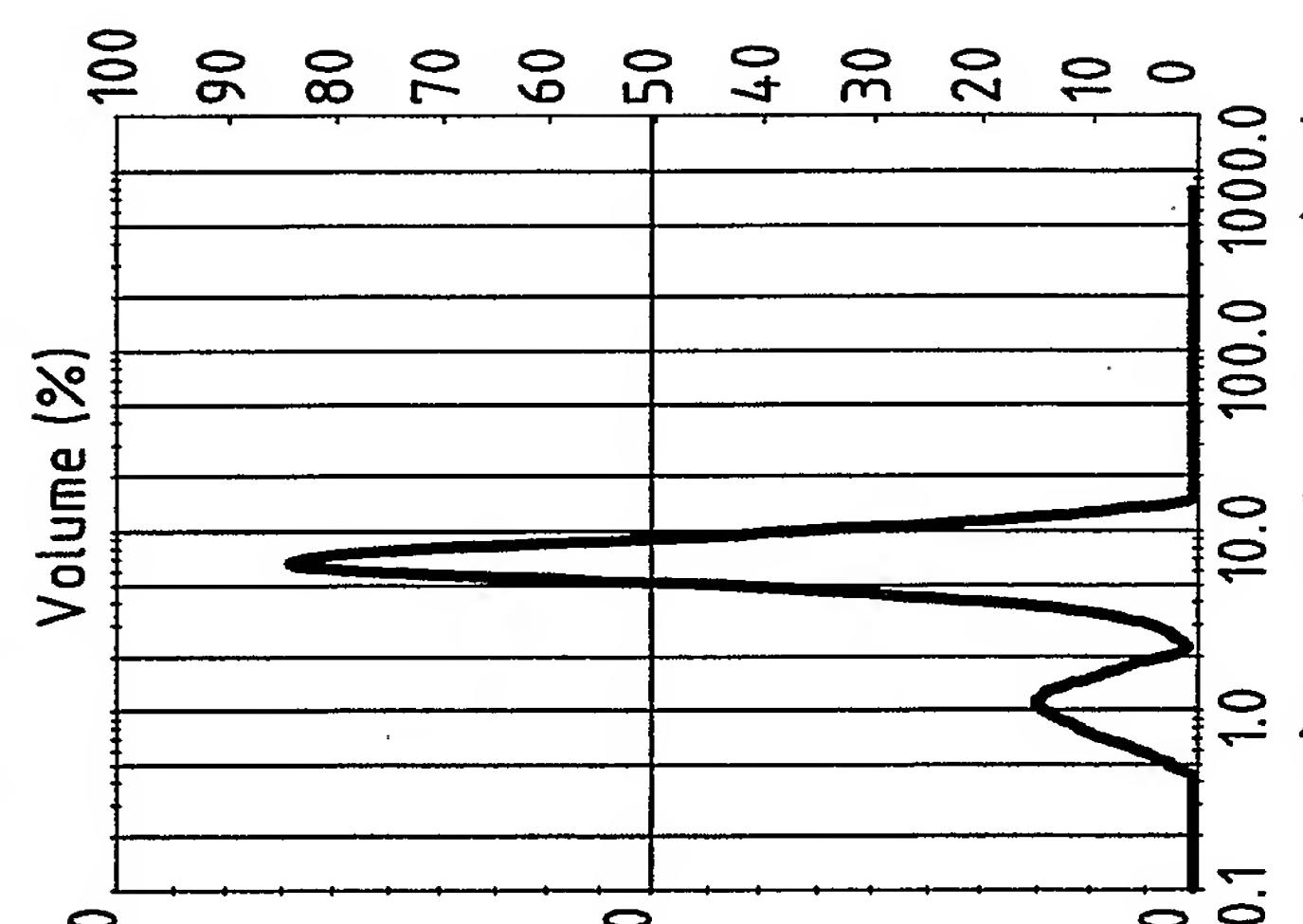
3/5



3a.



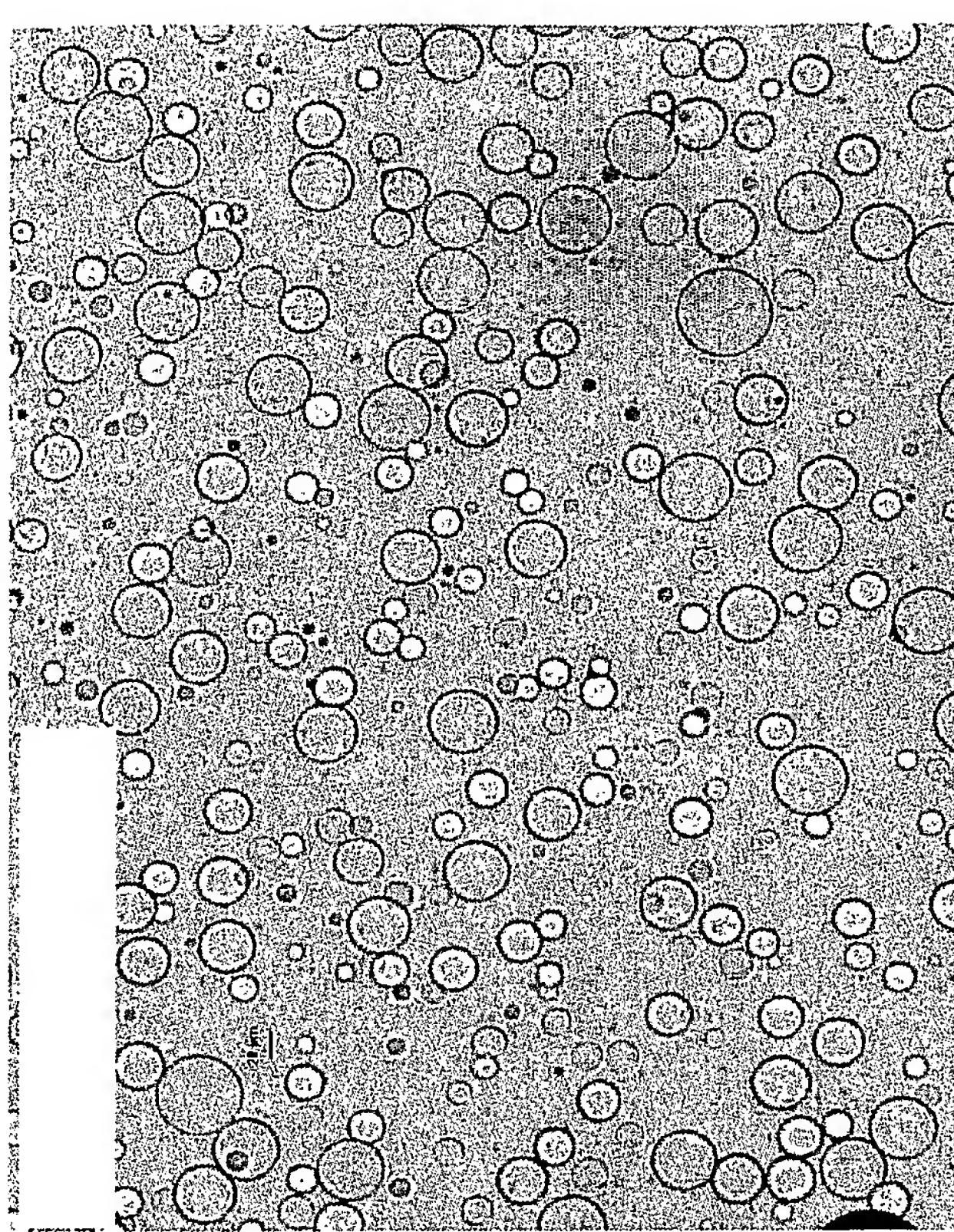
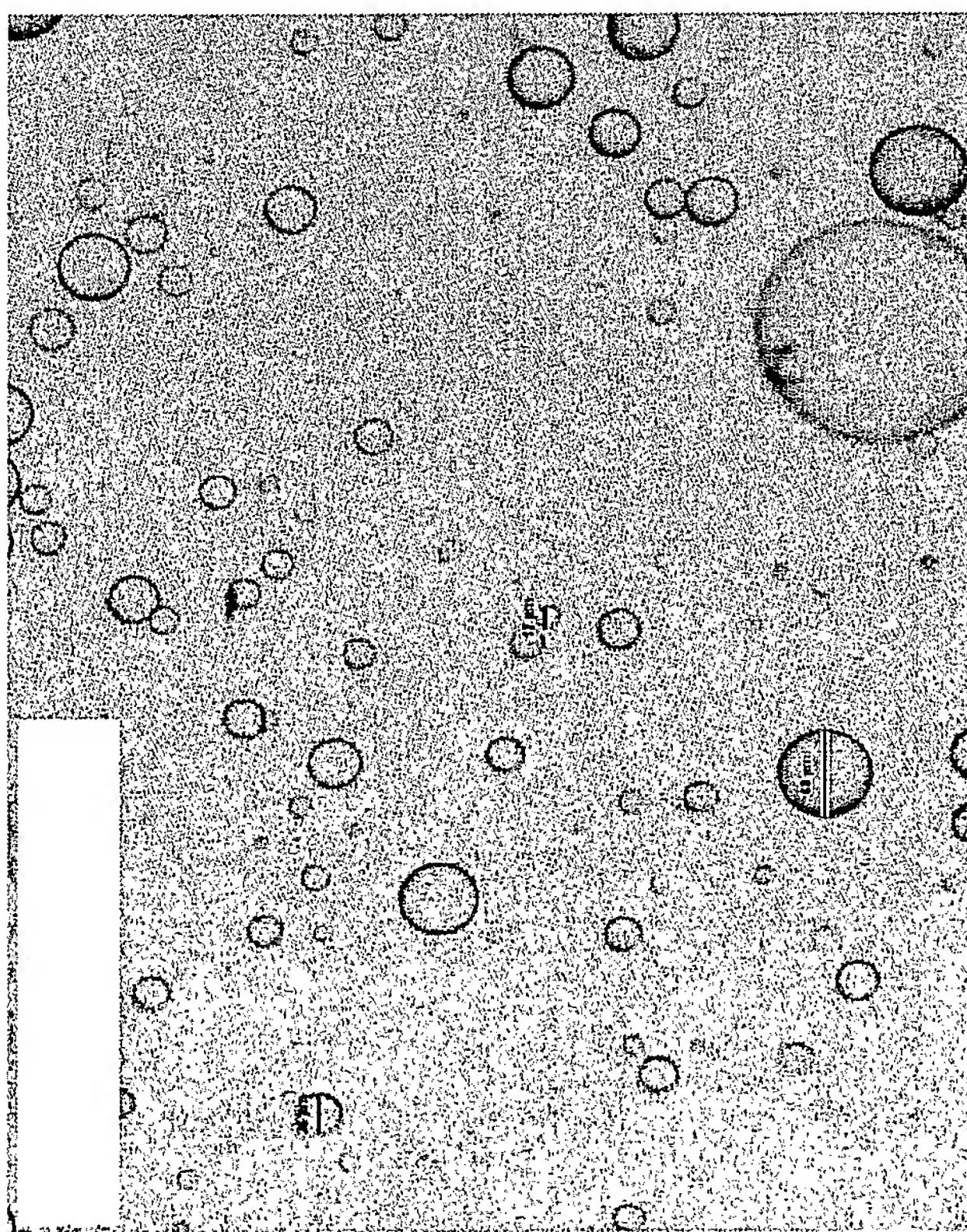
3b.



3c.

**FIG.3**

4/5

**4.b.****4.a.****FIG. 4**

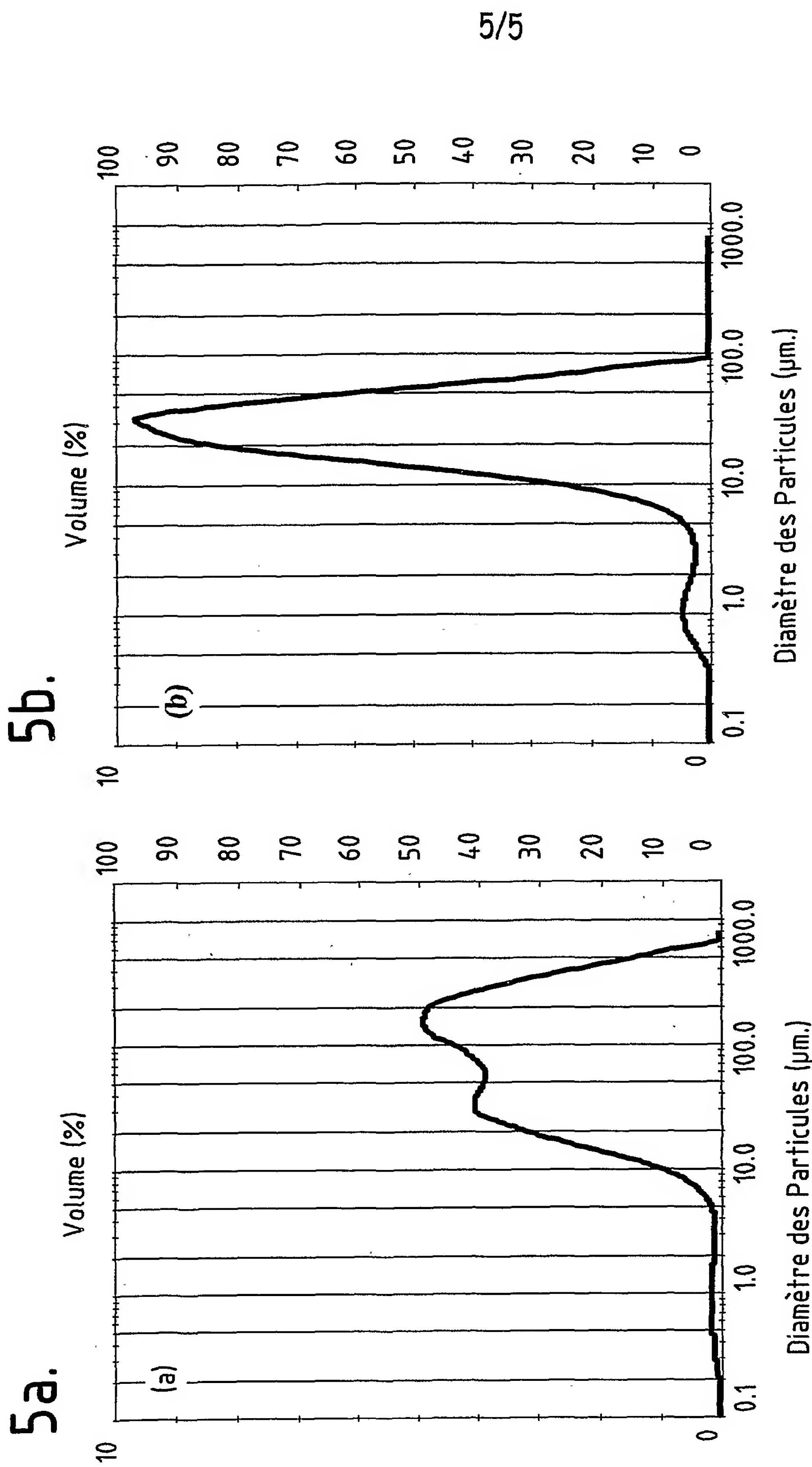


FIG. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000511

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 B01J13/12 B01J13/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>o</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/22409 A (UNIV DREXEL) 26 June 1997 (1997-06-26) page 7, line 7 – page 7, line 16 page 11, line 18 – page 11, line 22 page 13, line 21 – page 13, line 15; claims 18-26; examples 1-6 -----	1-20
X	WO 03/106809 A (COLLINS IAN RALPH ; DUNCUM SIMON NEIL (GB); BP EXPLORATION OPERATING () 24 December 2003 (2003-12-24) page 7, line 27 – page 8, line 8 page 9, line 9 – page 9, line 12 page 20, line 26 – page 21, line 25; claim 5; examples 1,2 -----	1-18
X	US 5 460 817 A (CHAMBERLAIN PETER ET AL) 24 October 1995 (1995-10-24) examples 1-11 ----- -/-	1-20



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

o Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2005

Date of mailing of the international search report

04/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL – 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Willsher, C

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**Interr Application No  
PCT/FR2005/000511**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 558 820 A (NAGANO HIDEO ET AL) 24 September 1996 (1996-09-24) the whole document -----	1-20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Intern

Application No

PCT/FR2005/000511

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9722409	A 26-06-1997	AU 1354497 A		14-07-1997
		WO 9722409 A1		26-06-1997
		US 5955143 A		21-09-1999
WO 03106809	A 24-12-2003	AU 2003232330 A1		31-12-2003
		CA 2488810 A1		24-12-2003
		EP 1511916 A1		09-03-2005
		WO 03106809 A1		24-12-2003
US 5460817	A 24-10-1995	US 5194263 A		16-03-1993
		US 5324445 A		28-06-1994
		AU 634719 B2		04-03-1993
		AU 4022789 A		01-03-1990
		CA 1339108 C		29-07-1997
		DE 68921266 D1		30-03-1995
		DE 68921266 T2		22-06-1995
		DK 2796 A		12-01-1996
		DK 171065 B1		13-05-1996
		EP 0356239 A2		28-02-1990
		EP 0626445 A2		30-11-1994
		FI 893957 A , B ,		25-02-1990
		JP 2102298 A		13-04-1990
		JP 2639844 B2		13-08-1997
		NO 893388 A , B ,		26-02-1990
		US 5492646 A		20-02-1996
		AU 637323 B2		27-05-1993
		AU 4022289 A		08-03-1990
		AU 637577 B2		03-06-1993
		AU 4022689 A		01-03-1990
		CA 1339347 C		26-08-1997
		CA 1336694 C		15-08-1995
		DE 68910925 D1		05-01-1994
		DE 68910925 T4		23-02-1995
		DE 68919942 D1		26-01-1995
		DE 68919942 T2		27-07-1995
		DK 171073 B1		28-05-1996
		DK 171054 B1		06-05-1996
		EP 0361677 A1		04-04-1990
		EP 0356240 A2		28-02-1990
		FI 893958 A		25-02-1990
		FI 893959 A , B ,		25-02-1990
		GR 3015411 T3		30-06-1995
		JP 2111718 A		24-04-1990
		JP 2824786 B2		18-11-1998
		JP 2150280 A		08-06-1990
		JP 2992558 B2		20-12-1999
		NO 893389 A , B ,		26-02-1990
		NO 893390 A , B ,		26-02-1990
		US 5744152 A		28-04-1998
		US 5035900 A		30-07-1991
		AT 114500 T		15-12-1994
		AU 639432 B2		29-07-1993
		AU 4857990 A		26-07-1990
		CA 2008139 A1		20-07-1990
		DE 69014322 D1		12-01-1995
		DK 379379 T3		08-05-1995
		EP 0379379 A2		25-07-1990
		ES 2066116 T3		01-03-1995

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000511

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5460817	A	ZA	9000406 A	27-03-1991
US 5558820	A	24-09-1996	JP 2729538 B2	18-03-1998
			JP 4260438 A	16-09-1992
			DE 69219393 D1	05-06-1997
			DE 69219393 T2	21-08-1997
			EP 0503291 A1	16-09-1992
			ES 2103838 T3	01-10-1997

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demai internationale No  
PCT/FR2005/000511

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 B01J13/12 B01J13/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97/22409 A (UNIV DREXEL) 26 juin 1997 (1997-06-26) page 7, ligne 7 – page 7, ligne 16 page 11, ligne 18 – page 11, ligne 22 page 13, ligne 21 – page 13, ligne 15; revendications 18-26; exemples 1-6 -----	1-20
X	WO 03/106809 A (COLLINS IAN RALPH ; DUNCUM SIMON NEIL (GB); BP EXPLORATION OPERATING () 24 décembre 2003 (2003-12-24) page 7, ligne 27 – page 8, ligne 8 page 9, ligne 9 – page 9, ligne 12 page 20, ligne 26 – page 21, ligne 25; revendication 5; exemples 1,2 -----	1-18
X	US 5 460 817 A (CHAMBERLAIN PETER ET AL) 24 octobre 1995 (1995-10-24) exemples 1-11 -----	1-20
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié ayant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Willsher, C

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Dema  
ternationale No  
PCT/FR2005/000511**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 558 820 A (NAGANO HIDEO ET AL) 24 septembre 1996 (1996-09-24) 1e document en entier -----	1-20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/000511

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9722409	A	26-06-1997	AU WO US	1354497 A 9722409 A1 5955143 A		14-07-1997 26-06-1997 21-09-1999
WO 03106809	A	24-12-2003	AU CA EP WO	2003232330 A1 2488810 A1 1511916 A1 03106809 A1		31-12-2003 24-12-2003 09-03-2005 24-12-2003
US 5460817	A	24-10-1995	US US AU AU CA DE DE DK DK EP EP FI JP JP NO US AU AU AU CA CA DE DE DE DE DK DK EP EP FI FI GR JP JP JP JP NO NO US US AT AU AU CA DE DK EP ES	5194263 A 5324445 A 634719 B2 4022789 A 1339108 C 68921266 D1 68921266 T2 2796 A 171065 B1 0356239 A2 0626445 A2 893957 A ,B, 2102298 A 2639844 B2 893388 A ,B, 5492646 A 637323 B2 4022289 A 637577 B2 4022689 A 1339347 C 1336694 C 68910925 D1 68910925 T4 68919942 D1 68919942 T2 171073 B1 171054 B1 0361677 A1 0356240 A2 893958 A 893959 A ,B, 3015411 T3 2111718 A 2824786 B2 2150280 A 2992558 B2 893389 A ,B, 893390 A ,B, 5744152 A 5035900 A 114500 T 639432 B2 4857990 A 2008139 A1 69014322 D1 379379 T3 0379379 A2 2066116 T3		16-03-1993 28-06-1994 04-03-1993 01-03-1990 29-07-1997 30-03-1995 22-06-1995 12-01-1996 13-05-1996 28-02-1990 30-11-1994 25-02-1990 13-04-1990 13-08-1997 26-02-1990 20-02-1996 27-05-1993 08-03-1990 03-06-1993 01-03-1990 26-08-1997 15-08-1995 05-01-1994 23-02-1995 26-01-1995 27-07-1995 28-05-1996 06-05-1996 04-04-1990 28-02-1990 25-02-1990 25-02-1990 30-06-1995 24-04-1990 18-11-1998 08-06-1990 20-12-1999 26-02-1990 26-02-1990 28-04-1998 30-07-1991 15-12-1994 29-07-1993 26-07-1990 20-07-1990 12-01-1995 08-05-1995 25-07-1990 01-03-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/000511

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 5460817	A	ZA	9000406	A
US 5558820	A	24-09-1996	JP	2729538 B2
			JP	4260438 A
			DE	69219393 D1
			DE	69219393 T2
			EP	0503291 A1
			ES	2103838 T3